

Elina Yamazaki  
TIMP-1-kudosinhibiittorin määrittäminen ELISA-menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalytiikka (AMK)  
Laboratorioanalytiikan koulutusohjelma  
25.10.2017

|   |   |
|---|---|
| Tekijä(t)<br>Otsikko<br>Sivumäärä<br>Aika   | Elina Yamazaki<br>TIMP-1-kudosinhibiittorin määrittäminen ELISA-menetelmällä<br>24 sivua + 8 liitettä<br>21.11.2017 |
| Tutkinto  | Laboratorioanalyttikko (AMK)  |
| Koulutusohjelma   | Laboratorioalan koulutusohjelma   |
|   |   |
| Ohjaaja(t)  | Dosentti Taina Tervahartiala<br>Lehtori Tiina Soininen  |
| <p>Opinnäytetyö suoritettiin Biomedicumissa, suu- ja leukasairauksien yksikössä Clinicumissa, professori Timo Sorsan tutkimusryhmässä, missä tutkimusten pääkohteena ovat humaaniperäiset Matriksin metalloproteiinaasit (MMP-proteiinaasit). Näistä MMP-proteiinaaseista erityisesti MMP-8-proteiinaasit on Sorsan tutkimusryhmä pystynyt osoittamaan muun muassa toimivaksi testimarkkeriksi iensairaudelle. Tutkimusryhmä tekee yhteistyötä niin kotimaisten kuin kansainvälisten tutkimusryhmien kanssa selvittääkseen MMP-proteiinaasien yhteyksiä ihmisten eri sairauksiin. Professori Timo Sorsan tutkijaryhmän jäsenet ovat pääosin peruskoulutukseen hammaslääkäreitä kuten hän itsekkin.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli analysoida ELISA-menetelmällä Matriksin metalloproteiinaasi-1 kudosinhibiittorin (TIMP-1-kudosinhibiittorin) pitoisuus 1093:sta eri seeruminäytteestä, joista aiemmin oli jo määritetty MMP-8-proteiinaasipitoisuus fluorometriin perustuvalla pitoisuusmäärittämismenetelmällä. Näin saatiin aineisto MMP-8/TIMP-1 moolisuhteen määrittämiseksi, minkä numerollisen arvon oletetaan korreloivan potilaan kliiniseen tilaan. Tarkoituksena oli siis tuottaa TIMP-1-proteiinaasin ja MMP-8-proteiinaasin pitoisuusmääritysten avulla tutkimusaineistoa selvitettäväksi, onko kyseessä olevan entsyymin ja sen estäjän seerumipitoisuuksilla merkittävää osuutta tutkimuspotilaiden tautitilassa innoittaen mahdollisiin lisätutkimuksiin tähdäten diagnostiikkaan tai hoidollisiin tavoitteisiin.</p> <p>Työssä vertailtiin myös seerumipitoisuuksia eri ELISA-kuoppalevyjen välillä ja standardien vaihtelua kuoppalevyjen välillä laadunvarmistuksen tarkkailemiseksi. Pohdittiin myös ELISA-menetelmässä ilmeneviä haasteita sekä pipetointitekniikkaa.</p> <p>ELISA-menetelmän todettiin olevan luotettava tapa tutkia suuria näytemääriä.</p> |   |
| Avainsanat  | ELISA, MMP-proteiinaasi, TIMP-1-kudosinhibiittori   |

|   |   |
|---|---|
| Author(s)<br>Title<br>Number of Pages<br>Date   | Elina Yamazaki<br>Determination of TIMP-1 Concentration by ELISA Method.<br>24 pages + 8 appendices<br>21.11.2017 |
| Degree  | Bachelor of Laboratory Services   |
| Degree Programme  | Degree Programme in Laboratory Sciences   |
|   |   |
| Instructor(s)   | Taina Tervahartiala Docent<br>Tiina Soininen, Senior Lecturer   |
| <p>The study was performed at Biomedicum, Department of Oral and Maxillofacial Diseases at Clinicum.</p> <p>The department is interested in Matrix metalloproteinases, primarily of MMP-8-proteinase, which has been shown to participate very effective in infections in the mouth, especial gum infection. The department cooperates with hospitals and other research groups that investigate MMP's effect on human diseases. Scientists at the Department are mainly dentists.</p> <p>The purpose was to analyze the concentrations of Matrix metalloproteinase-tissue inhibitor-1 (TIMP-1) by ELISA method. Sample MMP-8-proteinases concentrations were analyzed and the molar ratio of the results obtained was compared with an MMP-8/TIMP-1, which is considered to reflect clinical situation. This study, however, focused only on TIMP-1-tissue inhibitor measurement.</p> <p>Serum levels of ELISA well plates were also compared, as well as possible variation of standards within the well plates: the same standards were compared with each well plate. The challenges of the ELISA method and the pipetting technique are also discussed.</p> <p>The ELISA method was found to be a reliable way of examining large sample counts.</p> |   |
| Keywords  | ELISA, MMP, TIMP-1  |

## Sisällys

### Lyhenteet

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1   | Johdanto   | 1  |
| 1   | Matriksin metalloproteiinaasit (MMP-proteiinaasit)                           | 2  |
| 2   | Matriksin metalloproteiinaasin kudoshäibiittori (TIMP)                       | 5  |
| 2.1 | TIMP-1-kudoshäibiittori  | 6  |
| 2.2 | Esimerkki TIMP-1-kudoshäibiittorien ja MMP-proteiinaasien vuorovaikutuksesta | 7  |
| 3   | MMP-8 eli kollagenaasi -2  | 9  |
| 4   | Vuorovaikutus MMP-8-proteiinaasin ja TIMP-1-kudoshäibiittorin välillä        | 9  |
| 5   | ELISA-määrittäys   | 10 |
| 6   | Työn suoritus  | 11 |
| 6.1 | Tilastollinen analyysi   | 13 |
| 6.2 | Laaduntarkkailu  | 14 |
| 7   | Tulokset   | 14 |
| 7.1 | Levyjen näytekontrolli   | 14 |
| 7.2 | Standardivertailut   | 15 |
|     | Kuva 11. Standardisuorat   | 16 |
| 7.3 | Box Plot -kuvaaja standardeista  | 17 |
| 8   | Menetelmän tulosten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät                      | 18 |
| 9   | Päätelmät  | 23 |
|     | Lähteet  | 24 |
|     | Liitteet   |    |
|     | Liite 1. Kuoppalevyjen väliset vertailut                                     |    |
|     | Liite 2. Kuoppalevyjen sisäiset vertailut                                    |    |
|     | Liite 3. Reagenssit ja välineet  |    |

## Lyhenteet

TIMP-1      Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

MMP          Matriksin metalloproteinaasi

ELISA        Enzyme linked immunosorbent assay

## 1 Johdanto

Matriksin metalloproteinaasi on proteolyyttinen entsyymi, jonka kudoshäviötekijöistä TIMP-kudoshäviötekijä on yleisin. Näiden kahden epätasapainotilassa voi syntyä lukuisia eri sairauksia, joista yksi on kudostuhoa suussa aiheuttava parodontiitti. MMP-8-proteinaasin on todettu olevan merkittävä tekijä parodontiitin synnyssä. Parodontiitin ja MMP-8-proteinaasin yhteyttä on tutkittu yli kaksikymmentä vuotta ja niiden yhtenäisyys muiden sairauksien kanssa on osoitettu.

MMP-proteinaasipitoisuuksien löytyminen esimerkiksi seeruminäytteistä on tärkeä tieto koskien sairastuneen ihmisen diagnoosia sekä mahdollista lääkityksen aloittamista. Myös suun tulehduksen ja MMP-proteinaasien pääsy verenkiertoon suun kautta on osoitettu ja sitä kautta suun hoito on olennainen osa ihmisen kokonaisterveydentilaa.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli määrittää Matriksin metalloproteinaasi kudoshäviötekijän (TIMP- kudoshäviötekijä) pitoisuudet seerumeista. Toisena tavoitteena oli laaduntarkkailu ELISA-kuoppalevyjen välillä seerumeilla sekä standardeilla. Kolmantena tavoitteena oli tutkia ELISA-määritysten aikana ilmeneviä haasteita, jossa pohdittiin mahdollisia inhimillisiä virheitä pipetoinnin sekä työskentelyn aikana, tutkittiin pipettien ja kärkien luotettavuutta, pipetointitekniikkaa, muiden työssä käytettyjen välineiden luotettavuutta sekä ergonomian vaikutusta työskentelytulokseen.

Opinnäytetyö suoritettiin Biomedicumissa Helsingissä, suu- ja leukasairauksien osastolla professori Timo Sorsan tutkimusryhmässä. Osastolla tutkitaan muun muassa suun infektiotilojen yhteyttä muihin sairauksiin ja tulehduksiloihin. Tutkimusryhmä on erityisesti kiinnostunut Matriksin metalloproteinaaseista. Tutkimusryhmä tekee yhteistyötä niin kotimaisten kuin kansainvälisten tutkimusryhmien kanssa selvittääkseen MMP-proteinaasien yhteyksiä sairauksiin. Julkaisuja näistä tutkimuksista on kertynyt jo yli 500. Professori Timo Sorsan tutkijaryhmän jäsenet ovat pääosin koulutukseltaan hammaslääkäreitä.

Tutkimus oli osa kokonaistutkimusta, jossa toisella menetelmällä oli analysoitu samojen seeruminäytteiden MMP-8-proteinaasien pitoisuudet. Menetelmällä saatujen MMP-8-proteinaasien ja TIMP-1-kudoshäviötekijäpitoisuuksien pohjalta laskettiin MMP-8-proteinaasi/TIMP-1-kudoshäviötekijä moolisuhde.

## 1 Matriksin metalloproteinaasit (MMP-proteinaasit)

Solun ulkopuolinen matriksi sisältää sarjan proteinaaseja, joita kutsutaan Matriksin metalloproteinaaseiksi (*engl.* Matrix metalloproteinase, MMP). [1, s. 948.] Ne ovat entsyymiperhe, jotka ovat proteolyttisiä entsyymejä ja niillä on kyky hajottaa ja muokata lähes kaikkea solun ulkopuolista matriisia. MMP-proteinaaseja erittyy erilaisista solutyypeistä, kuten fibroblasteista, osteoblasteista, endoteelisoluista, magrofaageista, neutrofileistä sekä lymfosyyteistä. MMP-proteinaaseilla on erilaisia rooleja riippuen solujen tulehdussellisesta tilasta. Normaalissa fysiologisessa prosessissa ne ottavat osaa kudoksen uudistamiseen, kehitykseen ja haavan paranemisprosessiin. [2, s.77 - 104.]

Lisäksi MMP-proteinaasit toimivat immuunisäätiminä sekä prosessoivat myös lukuisia eri substraatteja, kuten pro- ja anti-inflamatorisia sytokiineja, kasvutekijöitä, kemokiineja ja seerumien komponentteja. MMP-proteinaasien on osoitettu kykenevän estämään tulehduksia, mutta myös tuhoavan kudoksia useissa eri tautitiloissa. [3.] Elimistömme normaaliin kudosten uusitumisprosesseihin MMP-proteinaasien on havaittu osallistuvan hyvin keskeisesti. [4, s.948].

MMP-proteinaasit ovat rakenteellisesti samankaltaisia, mutta geneettisesti hyvin erilaisia. Ihmisestä näitä jäseniä on löydetty 23 erilaista, mutta kaikkiaan niitä on löydetty yhteensä 28. MMP-proteinaaseja tavataan kolmea eri muotoa, pro-MMP (ei aktiivinen), aktiivinen MMP ja TIMP-MMP-kompleksi. [5.]

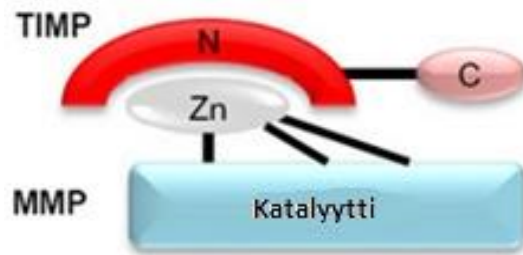
MMP-proteinaasit jaetaan niiden substraattispesifisyyden ja molekyyliarakenteiden mukaan eri ryhmiin. Gelatinaaseihin (MMP-2, MMP-9), joilla on ominaisuus pilkkoa denaturointia- ja tyypin IV kollageenia. Kollageenaaseihin (MMP-1, MMP-8, MMP-13), joilla on ominaisuus pilkkoa solujen väliainetta. Stromelysiineihin (MMP-3, MMP-10, MMP-11), jotka pilkkovat myös solujen väliainetta sekä aktivoivat MMP-proteinaaseja. Tyvikalvosidonnaisiin ja muihin MMP-proteinaaseihin (MMP-7, MMP-26, MMP-12, MMP-20, MMP-28, MMP-23, MMP-19, MMP-21, MMP-27) (5). MMP aktiivisuutta säädellään TIMP- (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinaasi) kudoshäviötorin avulla. [6.] Aktivointi voi tapahtua proteolyttisillä tai oksidatiivisilla (hapettavilla) tavoilla ja aktiivisuuden kontrollointiin on monia erilaisia keinoja, kuten entsyymi-inhibiittorit, kasvutekijät, hormonit sekä tulehdukselliset sytokiinit.

Kuvassa 1 nähdään MMP-proteinaaseista kollageenaasien sekä stromelysiinien rakenne yksinkertaisena muotona. Päädomeeni sisältää viestipeptidin (SP), pro-domeenin (Pro), katalyyttisen domeenin aktiivisella sinkkillä, liitosdomeenin (HG) sekä hemopeksiinidomeenin.



Kuva 1. MMP-proteinaasin päädomeeni [7].

Kuvasta 2 nähdään, kuinka TIMP-kudosinhibiittorin N-terminaali sitoutuu sinkkisidoksen aktiiviseen osaan estäen MMP-proteinaasin aktiivisuuden. [7, s. 21 - 36.]



Kuva 2. TIMP-kudosinhibiittorin sitoutuminen [7].

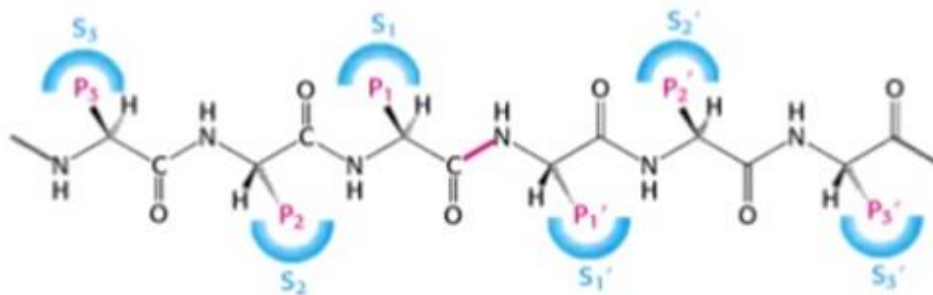
MMP-proteinaasit ovat laajin ryhmä kaikista proteinaasiryhmistä. Ne toimivat neutraalissa pH:ssa ja  $Zn^{+2}$ -ioni on niiden yleisin kofaktori. [8.]  $Zn^{+2}$ -ioni on sitoutunut domeeniin, joka on sen katalyyttinen osa. MMP-proteinaasit aktivoituvat normaalisti solun ulkopuolisessa tilassa. [9.]

MMP-proteinaasit ovat mukana myös muun muassa haavan paranemisprosesseissa, luun muodostumisessa, kasvamisessa ja tulehdusreaktioissa säätelijöinä. Näiden lisäksi se on mukana lukuisissa eri sairauksissa ja tulehdustiloissa, kuten esimerkiksi sydän- ja verisuonisairaudet, niveltulehdukset, diabetes, parodontiitti ja maksasyöpä. [8.]



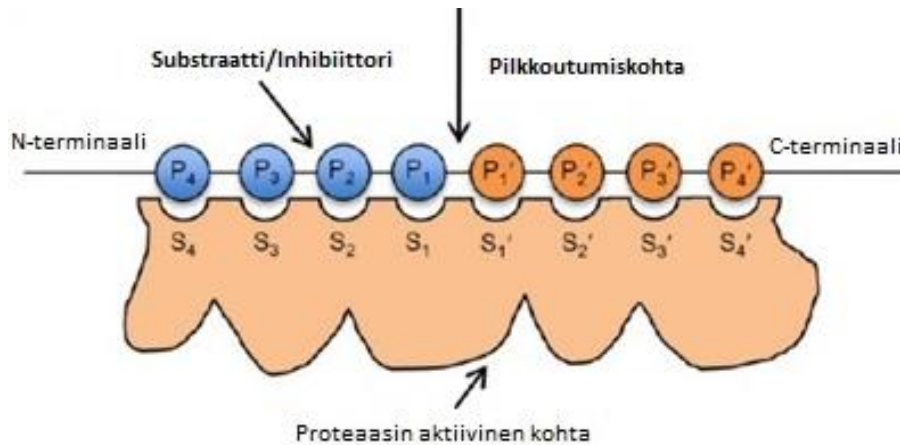
MMP-pitoisuuden noustessa, kuten esimerkiksi tulehduksissa, voi tapahtua kudostuhhoa. Tällöin neutrofiileistä vapautuu muun muassa MMP-8-entsyymiä, jotka auttavat neutrofiilejä tunkeutumaan verenkierrasta kudoksen tulehtuneeseen kohtaan tuhoten vieraita bakteereita. MMP-proteinaasit voivat myös aktivoida ja prosessoida muita MMP-proteiinaaseja, kuten esimerkiksi käynnistämällä pro-MMP (ei-aktiivisen) muodon aktiiviseksi muodoksi. Proteinaasien toiminta on tarkoin säädeltyä, mutta monimutkainen prosessi. [6.]

Katalyyttisen alueen lisäksi MMP-proteinaaseissa on lukuisia muitakin aktiivisia sivuosia (S), jotka ovat vuorovaikutuksissa substraattien tai inhibiittorien kanssa. Proteinaasin spesifisyys riippuu aminohappoa pilkkovan peptidisidoksen aminoterminaalista puolesta. Aminohapon jäännöksen aminoterminaalipuolen leikkautuvaa puolta kutsutaan P1, P2, P3 ja niin edelleen. Karboksyyli- ja karbonylpuolen jäännöksen leikkautuvaa puolta kutsutaan P1', P2', P3' ja niin edelleen. Vastaavasti entsyymien peptidisidosta kutsutaan S1, S2, S3 ja S1', S2', S3' ja niin edelleen (kuva 3). [10.]



Kuva 3. Leikkautuvien puolien nimitykset [11].

Funktionaaliset ryhmät substraateissa tai inhibiittoreissa ovat vuorovaikutuksessa sivuosien (S) kanssa. Näiden tähteiden erilaiset ominaisuudet antavat substraattispesifisyyttä eri MMP-proteinaaseille. Kuvassa 4 nähdään, miten aktiiviset osat ovat keskenään vuorovaikutuksissa. [12.]



Kuva 4. MMP-proteinaasien S2', S3', ja S4' sitoutuvat substraattien P2', P3', ja P4' kanssa [13].

## 2 Matriksin metalloproteinaasin kudoshinhibiittori (TIMP)

Matriksin metalloproteinaasin kudoshinhibiittorin (*engl.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, TIMP) tehtävänä on kontrolloida MMP-proteinaasien aktiivisuutta. TIMP-kudoshinhibiittorit ovat kudoksissa ja ruumiin nesteissä laajalle levinneitä entsyymi-inhibiittoreita ja niitä löytyy neljää eri perhettä; TIMP-1, TIMP-2 ja TIMP-3 ja TIMP-4. Jokaista näitä erittyy eri solulajikkeissa ja niillä on yhteisiä rakenneominaisuuksia [14]. Kaikilla neljällä TIMP-kudoshinhibiittorilla on yhtenäinen domeenin rakenne sekä 40 %:sesti sama aminohapposekvenssi, sisältäen 12 kysteinitähdettä, mikä johtaa kuuden rikkisidoksen syntymiseen. TIMP-kudoshinhibiittorit koostuvat rakenteellisesti ja toiminnallisesti erilaisista N- ja C-terminaalidomeeneista. Kaikkien TIMP-kudoshinhibiittorien N-terminaalidomeenien tarkoitus on inhiboida MMP-proteinaasien aktiivisuutta sitoutumalla sen  $Zn^{+2}$  aktiiviseen kohtaan. TIMP-kudoshinhibiittorin N-terminaalidomeeni on sekä välttämätön, että riittävä inhiboimaan MMP-proteinaaseja. [15.]

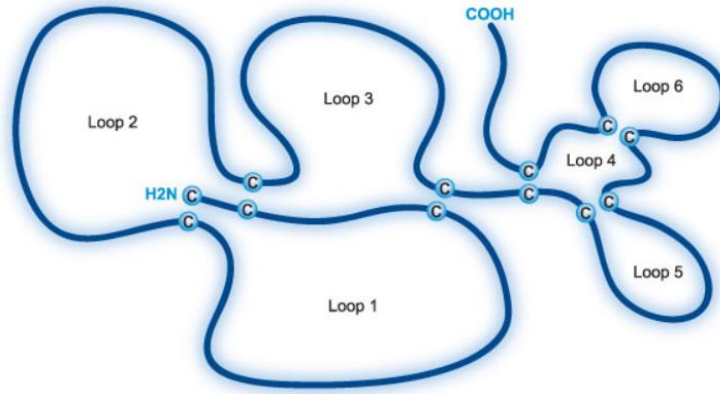
TIMP-kudoshinhibiittorit osallistuvat useisiin erilaisiin biologisiin tapahtumiin ja ne kykenevät inhiboimaan suurinta osaa MMP-proteinaasiperheen jäsenten synnyttämästä aktiivisuudesta sitoutumalla niiden katalyyttisten sinkkikofaktoreiden kanssa. Normaaleissa olosuhteissa TIMP-kudoshinhibiittoria löytyy kudoksista, joissa on meneillään uudistamista tai hajotusta. [14.] Ne ovat pieniä vakaita proteiineja, jotka inhiboivat MMP-proteinaaseja ei-kovalenttisin sidoksin [16]. TIMP-kudoshinhibiittorien ja MMP-proteinaasien tasapaino on ratkaisevassa roolissa solun ulkopuolisen matriisin homeostaasissa ja uusiu-

tumisessa, kun taas niiden epätasapaino aikaansaa monenlaisia sairauksia [17]. Tasapainotilanteessa suurimman osan MMP-proteinaaseista on osoitettu kykenevän sitoutumaan TIMP-1-kudosinhibiittorien kanssa (1:1) moolisuhteessa [18].

## 2.1 TIMP-1-kudosinhibiittori

MMP-proteinaasien inhibiittoreita on kahta eri pääalajia, TIMP-kudosinhibiittorit sekä  $\alpha 2$ -makroglobuliinit. TIMP-1-kudosinhibiittori on kudosinhibiittorista yleisin ja pystyy tukemaan solun jakaantumista sekä selviytymään monissa solutyypeissä. Ne ovat vuorovaikutuksessa MMP-1-, MMP-2-, MMP-3-, MMP-7-, MMP-8-, MMP-9-, MMP-10-, MMP-11-, MMP-12-, MMP-13- ja MMP-16-proteinaasien kanssa. MMP-14-proteinaasien kanssa vuorovaikutusta ei juuri esiinny. [19.] Tasapainon muuttuminen MMP-proteinaasien ja TIMP-1-kudosinhibiittorien välillä saa aikaan monia patogeenisiä prosesseja ja niihin liittyy kaikki jäsenet näistä kahdesta perheestä. Korkea TIMP-1-kudosinhibiittorin pitoisuutta esiintyy monissa sairauksissa, kuten esimerkiksi ALS:issa (Amyotrofinen lateraaliskleroosi), munuaissairauksissa sekä leviävissä kasvaimissa, kun taas matalaa TIMP-1-kudosinhibiittorin pitoisuutta esiintyy muun muassa iskeemisessä sydämen vajaatoiminnassa, parodontiitissa sekä kroonisissa tulehduksissa. [20.]

TIMP-1-kudosinhibiittori sisältää 12 kysteiinitähdettä, joista muodostuu kuuden loopin rakenne rikkisilloilla. TIMP-kudosinhibiittorin N-terminaali sitoutuu aktivoituneiden MMP-proteinaasien katalyyttiseen domeeniin inhiboimalla MMP-proteinaasien toiminnan. TIMP-1-kudosinhibiittori C-terminaali sitoutuu hemopeksiinidomeeniin säädellen näin MMP-proteinaasin toimintaa. Kuvassa 5 nähdään, kuinka TIMP-1-kudosinhibiittori laskeutuu itsenäisesti kuuden rikkisillan ja kahdentoista spesifisen Cys-tähteen tuloksena sekä tästä muodostuvat loopit. [20.]

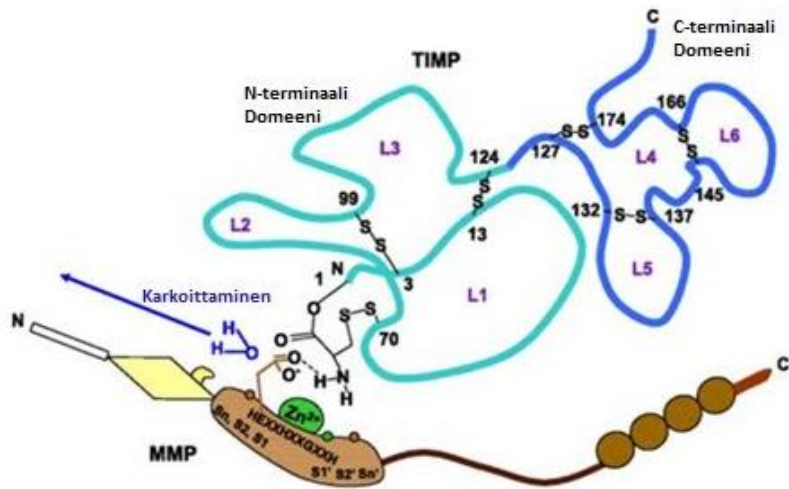


Kuva 5. TIMP-1-kudosinhibiittorin rakenne [22].

## 2.2 Esimerkki TIMP-1-kudosinhibiittorien ja MMP-proteinaasien vuorovaikutuksesta

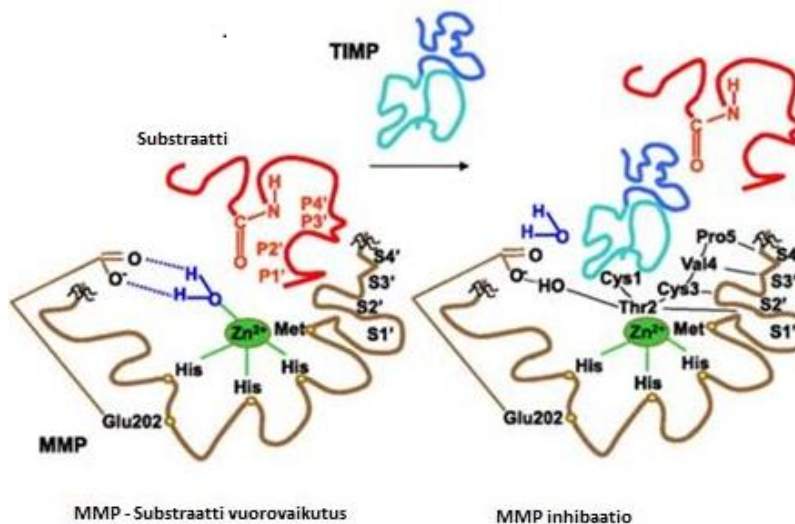
TIMP-1-kudosinhibiittori on 190 aminohappoa sisältävä glykoproteiini, jossa on N-terminaali domeeni (L1, L2 ja L3 luupeilla) 125:lla aminohapolla sekä C-terminaali domeeni (L4, L5 ja L6 luupeilla) 65:lla aminohapolla. N-terminaalissa sijaitsevat keskeiset disulfidisidonnaiset segmentit Cys1-Thr-Cys-Val4 sekä Glu67-Ser-Val-Cys70, ovat yhteydessä toisiinsa rikkisiltojen kautta, ollen näin olennainen MMP-proteinaasi-inhibiittori sitoutuessaan MMP-proteinaasin aktiiviseen kohtaan. [22.] Cys13 on rikkisillan kautta yhteydessä Cys124:ään, joka määrittää domeenin C-terminaalipään. TIMP-kudosinhibiittorin Cys1:ssä olevat karbonyyliryhmät ja  $\alpha$ -tyypiaminot ovat yhteydessä MMP-proteinaasin  $Zn^{2+}$ -ionin kanssa, jotka paikantuvat MMP-proteinaasimolekyylin kolmen histidiinin kautta HEXXHXXGXXH sekvenssiin. Inhiboitumismekanismin avain on metalli-ionin kaksisuuntainen koordinaatio N-terminaalisen  $\alpha$ -aminoryhmän ja Cys1:n karbonyyliryhmän kanssa. Tämä vuorovaikutus on ratkaiseva TIMP-kudosinhibiittorimolekyylin inhiboivaa aktiivisuutta varten, koska Cys-1:n  $\alpha$ -aminoryhmä syrjäyttää aktiivisen kohdan vesimolekyylin, joka on tärkeä peptidisidoksen hydrolyysille. [23.]

TIMP-kudosinhibiittorin  $\alpha$ -amino-ryhmä lohkaisee  $H_2O$ -molekyylin  $Zn^{2+}$ -sidoksesta sitoutumalla MMP-proteinaasin  $H_2O$ -pään kanssa, jolloin muodostuu vetysidos karboksylaattiryhmän kanssa. (kuva 6).



Kuva 6. TIMP-1-kudosinhibiittorin ja MMP-proteinaasin vuorovaikutus [22].

TIMP-1-kudosinhibiittorin Thr2-sivuketjut tulevat MMP-proteinaasin S1'-taskuun, määrittäen MMP-proteinaasin affiniteetin. Thr2-OH ryhmä voi olla myös vuorovaikutuksessa MMP-proteinaasin Glu202:n kanssa, mikä vahvistaa  $Zn^{2+}$ -sidoksen  $H_2O$ -molekyylin karkotuksen ja estää substraatin hajoamisen. Lisäksi TIMP-kudosinhibiittorin Cys3, Val4, sekä Pro5 ovat vuorovaikutuksessa MMP-proteinaasin S2', S3', ja S4' taskuissa P2'-, P3'-, ja P4' taskujen kanssa (kuva 7), joka edelleen estää substraatin sitoutumista ja hajoamista. Aminohapot osallistuvat  $Zn^{2+}$ -ioni- ja taskusidokseen, jotka vaihtelevat eri TIMP-kudosinhibiittorien välillä. [24.]



Kuva 7. TIMP-kudosinhibiittorin sitoutuminen MMP-proteinaasiin [22].

### 3 MMP-8 eli kollagenaasi -2

MMP-8-proteinaasi, toiselta nimeltään kollagenaasi-2 tai neutrofiili kollagenaasi, liitetään eritoten tulehdistiloihin. MMP-8-proteinaasia erittyy pääasiassa neutrofiileistä, mutta myös useista muista soluista kuten esimerkiksi magrofaageista, plasmasoluista, T-soluista, fibroblasteista ja epiteelisoluista. [25.] MMP-8-proteinaasia erittyy inaktiivisena pro-entsyyminä ja aktivaatio tapahtuu reagoimalla joko trypsiinin tai muiden MMP-proteinaasien kanssa. MMP-8-proteinaasin aktiivinen muoto on kollageeneja sekä sidekudosten proteiineja pilkkova entsyymi. [26.]

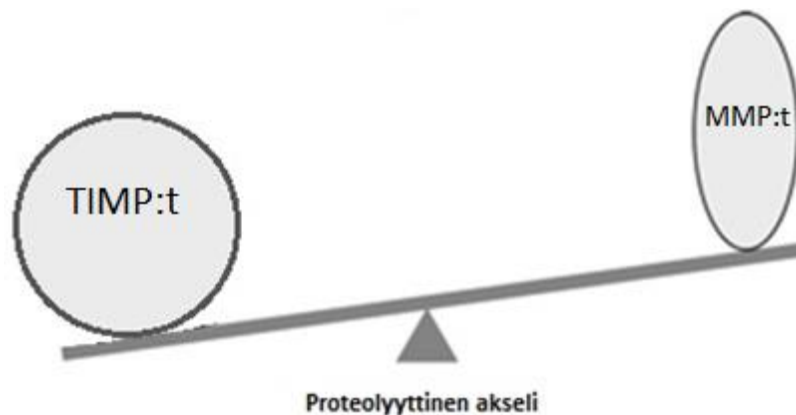
MMP-8-proteinaasin pitoisuus on koholla useissa solutyypeissä kroonisten tulehdusten aikana [28]. Sen on osoitettu pilkkovan kollegeenityyppejä II, III, VII, VII ja X sekä gelatiineja [29, s. 474 - 484]. Kohonneet ja aktivoituneet MMP-8-proteinaasipitoisuudet on osoitettu olevan yhteydessä moniin tauti- ja tulehdistiloihin, joista esimerkkeinä äkillinen hengitysvaikusoireyhy (ARDS) ja akuutti keuhkovaurio [30, ss. 790 - 798], syövä, parodontiitti, hammaskaries sekä ateroskleroosi. Seerumin MMP-8-proteinaasin on osoitettu olevan hyvä markkeri ennenaikaisen kuolemanriskin arvioimisen kannalta (31). TIMP-1-kudosinhibiittori on MMP-8-proteinaasin pääasiallinen inhibiittori. [32, ss.436 - 439]. MMP-8-proteinaasin aminohapposekvenssin pituus on 467 ja massa on 53,412 Da [33].

### 4 Vuorovaikutus MMP-8-proteinaasin ja TIMP-1-kudosinhibiittorin välillä

Moolisuhde on kahden kemiallisen reaktion piiriin kuuluvien yhdisteiden moolimäärien välinen suhde. MMP-8-proteinaasin ja TIMP-1-kudosinhibiittorin välisen moolisuhteiden normaaliolosuhteissa on tarkoitus olla tasapainossa. MMP-proteinaasin ja TIMP-kudosinhibiittorin välinen tasapaino on tärkeää kudosten ylläpidossa ja sen häiriö vaikuttaa kudoksen homeostaasiin. Tilannetta voi kuvata vaakatilanteena (kuva 8), jossa moolisuhteen laskennallisen luvun ollessa alle yhden TIMP-kudosinhibiittorien osuus molaaarisesti on suurempi kuin MMP-proteinaasien, kuvaten niin kutsuttua normaalia tilaa.

Tautitilanteessa MMP-8-proteinaasin pitoisuuden noustessa TIMP-1-kudosinhibiittorin pitoisuus laskee, jolloin sen kyky inhiboida MMP-8-proteinaasin laskee. Kuvassa 8 oleva vaakasetelma muuttuu tällöin päinvastaiseksi ja laskennallinen MMP-8-proteinaasin /TIMP-1-kudosinhibiittorin moolisuhdeluku on suurempi kuin yksi, kun määrällisesti

MMP-8-proteinaasin mooleja on enemmän kuin TIMP-1-kudosinhibiittorin mooleja. Professori Timo Sorsan tutkimusryhmän aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että tämä moolisuhteen laskennallinen malli on useissa tautitilanteissa suuntaa antava kliinisen tautitilan kanssa. Muun muassa lääkitys voi vaikuttaa tasapainotilaan ja lääkityksen avulla moolisuhde voidaan saada takaisin halutulle tasolle.

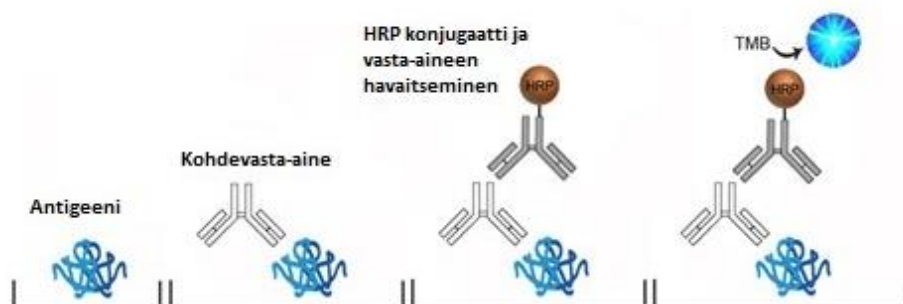


Kuva 8. Tasapainotilan muutos MMP-proteinaasin ja TIMP-kudosinhibiittorin moolisuhteessa [34].

## 5 ELISA-määrittäminen

TIMP-kudosinhibiittoria analysoitaessa yksi keskeinen menetelmä on ELISA vasta-ainemääritys, jossa vasta-aineen ja antigeenin sitoutuminen toisiinsa saadaan esille entsyymileimatun vasta-ainemolekyylin avulla [35]. Entsyymileimattu vasta-aine reagoi substraatin kanssa, jolloin saadaan aikaan väriä vaihtanut tuote, joka voidaan mitata spektrometrisesti. [36].

ELISA-määrittämiä on kahta erilaista, ei-kilpaileva ja kilpaileva immunomääritys. Ei-kilpailevassa määrittämisessä kaivojen pohjat oli peitetty spesifisellä vasta-aineella/antigeenillä ja niihin vuoron perään pipetoidut näytteet ja reagenssit reagoivat keskenään. Pipetointi tapahtuu peräkkäisissä järjestyksissä, jotta jokainen pipetoitu aine reagoi vuorollaan kuopassa olevaan reagenssiin/antigeeniin (kuva 9). Standardikuvaajasta tulee suora, jolloin vasta-ainemäärän kasvaessa signaali kasvaa. Kilpailevassa määrittämisessä kuoppalevyille pipetoidaan samanaikaisesti sekä näyte, että leimattu vasta-aine, jotka kilpailevat spesifisestä sitoutumiskohdasta. Kilpailevassa määrittämisessä standardikuvaajasta tulee laskeva. [37].



Kuva 9. Antigeenin ja vasta-aineen sitoutuminen [38].

## 6 Työn suoritus

Työssä analysoitiin seeruminäytteitä, joita oli kerätty yhteensä 1093 kappaletta noin neljältä sadalta eri potilaalta. Seerumit oli kerätty kolmena eri ajan funktiona; kahden viikon, neljän viikon ja neljän kuukauden jaksoissa. Seerumit olivat olleet säilytyksessä pakastimessa noin puoli vuotta.

Työ suoritettiin pipetoimalla standardit ja seeruminäytteet kuoppalevyille, jotka analysoitiin spektrometrisesti. Laaduntarkkailua varten seeruminäytteitä poimittiin satunnaisesti ja niitä pipetoitiin toisille kuoppalevyille, jolloin voitiin verrata tulosten vaihtelua eri kuoppalevyjen välillä. Laaduntarkkailuun käytettiin myös duplikaatteina tehtyjä standardeja. Standardi oli mukana kitissä, josta tehtiin laimennokset. Jokaiselta kuudeltatoista kuoppalevyltä tehtiin viisi eri kalibrointisuoraa, joista laskettiin keskiarvot ja sijoitettiin ne samalle suoralle.

Työssä käytettiin pakastettuja seeruminäytteitä (-18 °C). Seerumeista tehtiin tarkka kartta 96-kuoppalevyn kaivojen suhteen, niin että jokainen näyte oli merkattu omalle kaivolle. Standardeille ja nollanäytteille oli myös omat merkatut kaivonsa. Seeruminäytteet laitettiin koeputkitelineeseen siten, että jokainen näyte oli samalla paikalla missä se oli sekä kartalla, että 96-kuoppalevyllä. Näin varmistettiin mahdollisimman hyvin, että jokainen näyte pipetoitiin oikeaan kaivoon. Myös pipettitelineen pipettien kärjet vastasivat pohjaltaan 96-kuoppalevyä, joten pipettien kärjetkin otettiin samassa järjestyksessä, kuin missä näytteet olivat. Seeruminäytteet otettiin pakastimesta sen mukaan, mitä osiota analysoitiin ja sulatettiin ne tasoravistelijan päällä.



Työssä käytettiin Amersham Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1), Human, Biotrak, ELISA System-kittiä, joka säilytettiin -18 °C:ssa pakasteessa (liite 3). Nestemäiset reagenssipullot sulatettiin tasoravistelijassa ja jauhemaiset (kylmäkuivatut) pöydällä. Myös kuoppalevy pakkasesta sulatettiin. Sulatukseen meni aikaa noin 30 minuuttia. Työ suoritettiin kitin ohjeita noudattaen.

Standardit (100 ng Lyophilized, (liite 3)) tehtiin dublikaatteina jokaiselle kuoppalevylle ja niiden pitoisuudet olivat 0 näytteen lisäksi; 3,13 ng/ml, 6,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml ja 50 ng/ml.

Spesifinen vasta-aineella peitetyn kuoppalevyn pohjalle pipetoitiin standardit sekä näytteet omille merkatuille paikoilleen, jolloin niissä olevat mahdolliset TIMP-1-proteinaasit sitoutuivat kiinteään faasin pinnalla olevaan vasta-aineeseen. Näytteen inkubaation ja poispesun jälkeen kaikki sitoutumattomat molekyylit huuhtoutuivat pois ja kaivoihin pipetoitiin värireaktion tuottava konjugaatti (Lyophilized anti-TIMP-1 Horseradish peroxidase, (liite 3)). Toisen inkubaation ja poispesun jälkeen kaikki sitoutumattomat molekyylit huuhtoutuivat jälleen pois ja päälle pipetoitiin 3,3',5,5'-tetmetylbenzidiini-vetyperoksidi (TMB) substraattia, joka aikaansai sinisen värireaktion. Värireaktio pysäytettiin rikkihapolla, joka aiheutti sinisen värin muuttumisen keltaiseksi samassa värin intensiteetti suhteessa. Keltaisen värireaktion intensiteetti mitattiin 450 nm aallonpituudella spektrometrillä VICTOR X4 mikrolevylukulaiteella. Luku tuli suorittaa rikkihapon lisäämisen jälkeen 30 minuutin sisällä. Mittauksesta saatava optisen tiheyden arvo 450 nm aallonpituudella on suoraan verrannollinen sitoutuneen vasta-aineen määrään.

Työtä suorittaessa päätettiin, mikä seerumiperhe poimittiin uudelle kuoppalevylle analysoitavaksi, jolloin saatiin tulosten vertailut suoritettua. Edellisen kuoppalevyn positiivisena kontrollina käytetty seeruminäyte pipetoitiin uudelle kuoppalevylle ja pistokokeena muutamia saman potilaan kaikki kolme seeruminäytettä. Tärkeää oli myös saada saman henkilön kaikki seeruminäytteet pipetoitua samalle kuoppalevylle, jotta pienet mahdolliset erot kuoppalevyjen ja reagenssien suhteen eivät vaikuttaisi analyysihin.

Kaikkien tulosten ollessa valmiita tehtiin laskelmat ensin standardeista. Jokaisen kuoppalevyn standarditulokset kerättiin järjestyksessä niin, että standardi yhden kahteen kertaan tehdystä analyysistä laskettiin jokaiselta kuoppalevyltä keskiarvot ja niiden % CV. Sama toistettiin jokaiselle viidelle standardille.

Seuraavaksi poimittiin näytteet, joita oli analysoitu kahdesta neljälle eri kuoppalevyille ja samoin laskettiin niistä % CV. Laaduntarkkailun näytteitä oli yhteensä 29 potilaalta.

## 6.1 Tilastollinen analyysi

Kitin viiden standardin pitoisuuksia verrattiin levykohtaisesti sekä levyjen välillä suoritettiin näytekohtainen vertailu. Kuoppalevyjen välillä tehdyistä tarkasteluista laskettiin % CV eli variaatiokerroin, jonka kyseisen analyysin kitin ohjeen mukaan olisi pitänyt olla alle 15%. Saman kuoppalevyn sisällä tehtyjen standardien vertailussa laskettiin myös % CV, jonka tuli kitin ohjeen mukaan olla alle 10%. Molemmista laskettiin lisäksi keskihajonnat sekä keskiarvot.

Variaatiokerrointa (*engl.* coefficient of variation, CV), hajontalukua, käytetään kun halutaan verrata kahden otoksen tai ryhmän hajontaa keskenään. Muuttujasta lasketaan keskiarvo, jota verrataan keskihajontaan. Keskiarvo ja keskihajonta vaihtelevat analyysien arvojen mukana, joten niitä on hankalaa verrata keskenään. Tämän takia variaatiokerroimen käyttö on mielekkäänpää. Keskihajonta kertoo yksittäisten havaintojen suhdetta niistä saatuihin keskiarvoihin.

Tässä työssä analysoitiin eri kuoppalevyjen välillä olevien samojen näytteiden suhdetta toisiinsa. Tämä tehtiin laskemalla niiden variaatiokertoimet. Tarkasteltiin myös kuoppalevyn sisällä olevien standardien ja sisäisten kontrollien suhdetta ja tarkasteltiin tuloksia. Työohjeessa, jota analyysissä käytettiin, mainittiin sallittu % CV. Verrattiin itse laskettuja tuloksia työohjeen tuloksiin.

Keskihajonta lasketaan kaavalla

1

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

[47].

Variaatiokerroin lasketaan kaavalla

$$V = s / \bar{x} \times 100\%$$

2

jossa  $s$  on muuttujan keskihajonta ja  $\bar{x}$  on muuttujan keskiarvo [48].

## 6.2 Laaduntarkkailu

Seeruminäytteitä oli yhdeltä potilaalta keskimäärin kolme kappaletta, jotka olivat otettu kolmella eri ajan funktiolla; kahden viikon, neljän viikon ja neljän kuukauden jaksoissa. Oletuksena oli, että ensimmäisen seerumin mittausarvo ja viimeisin mittausarvo olisivat laskevia, jolloin mahdollinen TIMP-1-kudosinhibiittorin pitoisuus olisi jo seerumista hieman poistunut. Tiedossa ei kuitenkaan ollut seeruminäytteistä sitä, onko se sairaan vai terveen potilaan tai onko hänellä mahdollista lääkitystä käytössä, joten tässä työssä näillä tuloksilla ei ollut käyttöä. Muuttumissuhdetta levyjen välillä pystyttiin kuitenkin tarkastelemaan. Työn tuloksissa katsottiin, että dublikaatteina tehdyt standardit olivat oikeaoppisesti suoran mukaisia ja tarkastettiin, että saadut absorbanssi-arvot mahtuivat saadulle suoralle.

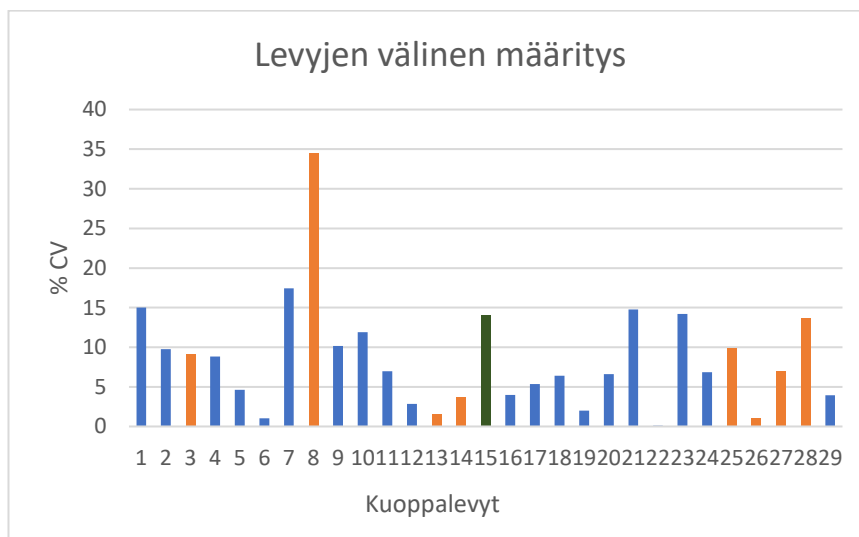
## 7 Tulokset

### 7.1 Levyjen näytekontrolli

Analysoituja seeruminäytteitä oli yhteensä 1093 kappaletta, joista mitatut TIMP-1-kudosinhibiittoripitoisuudet olivat välillä 1-204,4 ng/ml. Pitoisuudet ovat normaaleja välillä 75 - 90 ng/ml [50, 51], joskin ne voivat vaihdella hieman eri firmojen kiteillä. Saaduista tuloksista 230 seerumipitoisuutta olivat normaalipitoisuuksien sisällä ja loput 863 normaalipitoisuuden ulkopuolella, joista voisi päätellä jonkinlaista tautitilaa kyseisillä potilailla.

Määritysvertailuja tehtiin 29:lle eri seeruminäytteelle, jotka pipetoitiin siten, että 20 näytettä pipetoitiin kahdelle eri levyille, kahdeksan näytettä kolmelle eri levyille ja yksi näyte neljälle eri levyille (liite 1).

Tuloksia tarkastellessa kuoppalevyjen välillä lasketuista seerumiarvoista todettiin, että 27 näytettä olivat  $\% CV < 15 \%$ , mitä pidetään hyväksyttävänä arvona. Sen sijaan kaksi arvoa ylitti hyväksytyn arvon, näyte seitsemän  $\% CV$  oli 17,42 % ja näyte kahdeksan  $\% CV$  oli 34,54%, (kuva 13). Näytettä seitsemän oli vertailussa kaksi kappaletta ja näytettä kahdeksan kolme kappaletta. Suuri poikkeama,  $\% CV$  34,54 %, analysoitiin uudelleen, jolloin saatiin lähellä hyväksyttyä raja-arvoa olevat tulokset. Oletukseksi tuli, että suuresti poikkeavassa tuloksessa on sattunut jonkinlainen pipetointivirhe. Toisen korkeamman arvon saanut tulos, (17,42 %), ei ollut kuitenkaan niin paljoa koholla, ettei sen luotettavuus olisi vielä ollut sallittu. Alla olevassa pylväskaaviossa sinisellä on merkitty kahdella eri levyllä määritetyt näytteet, oranssilla on merkitty kolmella eri levyllä määritetyt näytteet ja vihreällä neljällä eri levyllä määritetty näyte. (Liite 1).

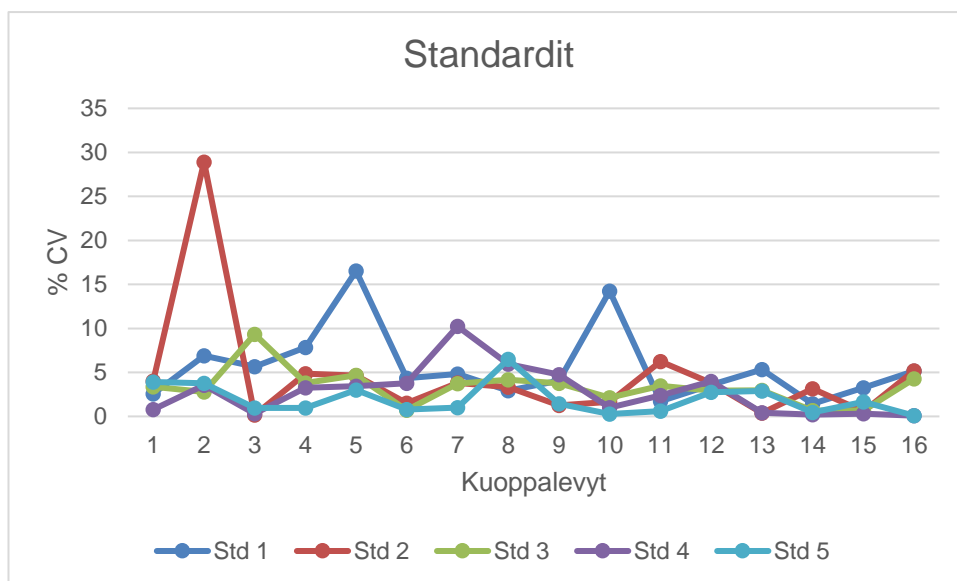


Kuva 10. Levyjen väliset määrittäytulokset

## 7.2 Standardivertailut

Standardi yhden kaikkien yhteenlaskettu  $\% CV$  keskiarvo oli 5,65, jossa kuudestatoista arvosta kaksi oli yli sallitun 10 %:a; levy viiden 16,52 ja levy kymmenen 14,23 (liite 2/1). Standardisuoran vaikutus tuloksiin varmistettiin poistamalla korkein mittaustulos suoralta. Standardi kahden kaikkien yhteenlaskettu  $\% CV$  keskiarvo oli 4,59, joista yksi oli yli sallitun; levy kahden 28,91 (liite 2/2). Samoin kuin edellä, tästäkin standardisuoralta poistettiin kyseinen korkea tulos. Standardi kolmen kaikkien yhteenlaskettu  $\% CV$  oli 3,34 eli ei löytynyt yli 10 %:a ylittäviä arvoja (liite 2/3). Standardi neljän kaikkien yhteenlaskettu  $\% CV$  oli 2,77 eli ei löytynyt yli 10 %:a ylittäviä arvoja (liite 2/4). Standardi viiden kaikkien

yhteenlaskettu % CV oli 1,94 eli ei löytynyt yli 10 %:a ylittäviä arvoja (liite 2). Standardisuorat nähdään kuvasta 11.



Kuva 11. Standardisuorat

Kuudentoista standardisuoran % CV taulukosta nähdään jokaisen levyn arvot.

Taulukko 1. Standardien % CV

| Levy | Std1     | Std2     | Std3     | Std4     | Std5     |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|
|      | %CV      | %CV      | %CV      | %CV      | %CV      |
| 1    | 2,548828 | 4,023097 | 3,381301 | 0,79337  | 3,925851 |
| 2    | 6,87714  | 28,91139 | 2,791286 | 3,549597 | 3,747601 |
| 3    | 5,666975 | 0,168206 | 9,334337 | 0,312462 | 0,960326 |
| 4    | 7,849143 | 4,868873 | 3,78522  | 3,264861 | 0,977407 |
| 5    | 16,52133 | 4,636376 | 4,660264 | 3,423922 | 3,012023 |
| 6    | 4,342054 | 1,51827  | 0,715474 | 3,772246 | 0,772313 |
| 7    | 4,831528 | 3,809841 | 3,734847 | 10,22622 | 0,994462 |
| 8    | 2,941777 | 3,328537 | 4,158422 | 5,940721 | 6,478442 |
| 9    | 4,062455 | 1,239684 | 3,781747 | 4,738606 | 1,42428  |
| 10   | 14,23439 | 1,639574 | 2,133236 | 0,987526 | 0,289019 |
| 11   | 1,741172 | 6,219052 | 3,479016 | 2,387444 | 0,592241 |
| 12   | 3,595176 | 3,806546 | 2,919354 | 3,985595 | 2,742693 |
| 13   | 5,3101   | 0,375785 | 2,949662 | 0,429547 | 2,881178 |
| 14   | 1,435782 | 3,132895 | 0,655385 | 0,185616 | 0,458188 |
| 15   | 3,263094 | 0,566693 | 0,67522  | 0,296821 | 1,654159 |
| 16   | 5,137591 | 5,165333 | 4,255514 | 0,082934 | 0,082934 |

Tehdyn kitin ohjeen mukana standardipitoisuuksille oli optisen tiheyden tavoitearvo aallonpituudelle 450 nm. Esimerkki levytä kahdeksan, josta nähdään standardipitoisuudet, dublikaatteina saadut arvot sekä tavoitearvo.

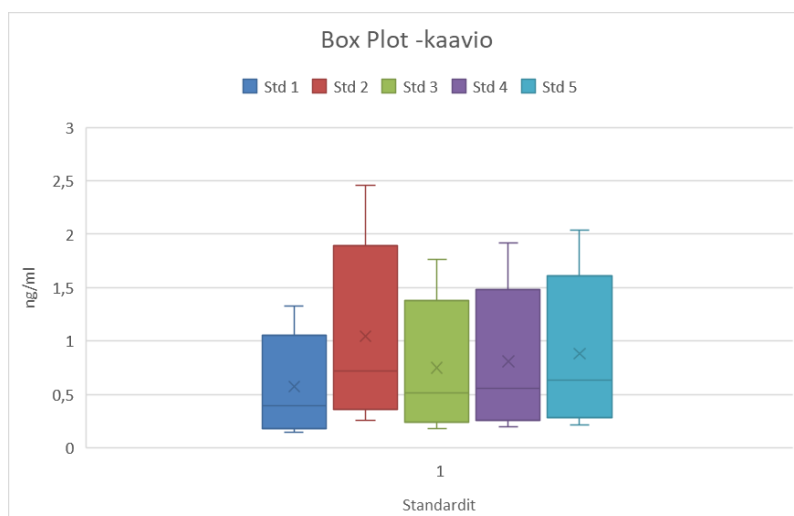
Taulukko 2. Standardiarvot levytä kahdeksan

| Levy 8 | Pitoisuus ng/ml | 1        | 2        | Tavoitearvo |
|--------|-----------------|----------|----------|-------------|
| Std1   | 3,13            | 0,197128 | 0,189094 | 0,184       |
| Std2   | 6,25            | 0,319416 | 0,304726 | 0,29        |
| Std3   | 12,5            | 0,561395 | 0,529323 | 0,475       |
| Std4   | 25              | 1,06956  | 0,983324 | 0,88        |
| Std5   | 50              | 1,99747  | 1,82248  | 1,703       |

### 7.3 Box Plot -kuvaaja standardeista

Jokaisesta standardista tehtiin Box Plot -kuvaaja aallonpituudelle 450 nm, jossa nähdään pienin arvo, suurin arvo, alaneljännes, yläneljännes sekä mediaani. Kaaviosta nähdään määrällisten muuttujien arvojen jakaumat. Standardista 2 nähdään suuri arvojakauma. Kyseisen standardin kohdalla oli saatu yksi arvo, joka vaikuttaa arvojakauman suureen heittoon. Jakauman laatikoiden alaosa vastaa arvojakauman alaneljännestä ja yläosa yläneljännestä. Keskellä nähdään mediaani.

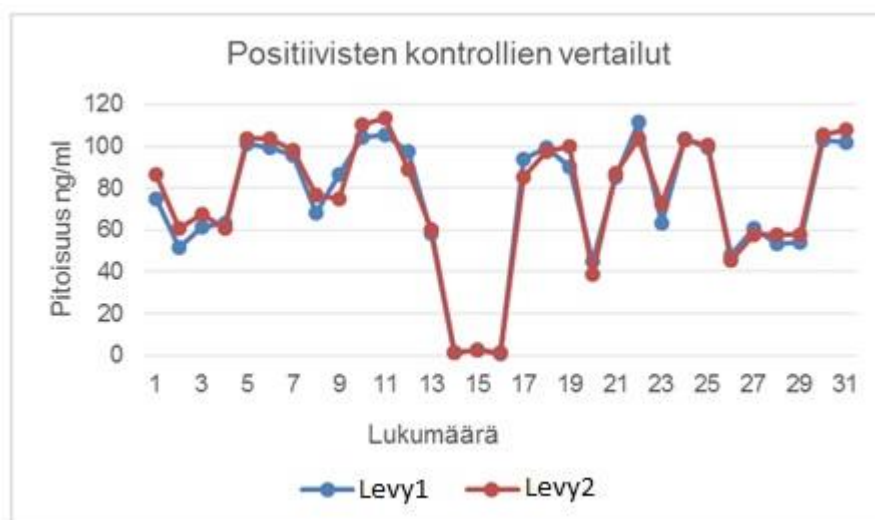
Taulukko 3. Box Plot -kaavio standardeista



## 8 Menetelmän tulosten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät

Työn tuloksia tarkastellessa ei ollut tiedossa, oliko analysoitu seerumi terveen vai sairastuneen ihmisen. Näytteet olivat anonyymeinä mahdollisten ”ohjattujen” virheiden estämiseksi. Mahdolliset verrokkiryhmät olivat todennäköisesti mukana analyyseissä, joten mahdolliset pitoisuuksien heittelyt olivat tästäkin syystä ymmärrettäviä. Jos yhdellä levyllä saman potilaan tulokset näyttivät kyseenalaiselta, tehtiin analysointi uudelleen. Tuloksia tarkastellessa huomattiin, että kaikki uudelleen analysoidut tulokset olivat melko samoja. Analysoinnin yhteydessä tarkkailtiin positiivisten kontrollien eroja levyjen välillä, että ne olisivat suurin piirtein samoissa arvoissa.

Taulukko 4. Levyjen positiivisten kontrollien vertailut



Seeruminäytteiden määrän ollessa 1093 kappaletta, oli olennaista olla erittäin huolellinen näytemerkinnöissä sekaannusten välttämiseksi. Näytteiden kirjaaminen Exceliin ja niiden sinne oikeaan järjestykseen saaminen oli helppoa näyteputkiin merkittyjen numerokoodien ansiosta.

Analysoitaessa suuria määriä näytteitä, on tuloksen luotettavuuden kannalta tärkeää pohtia jo ennen työn aloittamista kaikki työssä käytettävät reagenssit, kitit, aineistot, työskentelytavat ja välineet. Työn laatuun on kiinnitettävä erityisesti huomiota, koska on isosta aineistosta kyse. Jos työskennellessä tapahtuu useita virheitä, tulee pohdintaan, voiko tuloksiin ylipäänsä luottaa. Hyvä on myös huomioida analyysin kustannukset, koska yksi valmis ELISA-kitti maksaa useita satoja euroja (noin 500 - 700€), on tärkeää

aloittaa työskentely niin, että kaikki valmistelut on tehty huolellisesti, jottei virheitä tapahtuisi. Jokaisella työskentelijällä on omansalainen ”käden jälki” ja olisikin optimaalista suuria näytemääriä analysoidessa suorittaa työ niin, että yksi tekijä analysoisi koko näytemäärän.

Pipettien kalibrointi on ensisijaisen tärkeää ja on pidettävä huolta, että ne tehdään aina ajallaan joko itse tai huollon toimesta. Kalibrointiajoista on pidettävä tarkkaa kirjausta ja pipetteihin on hyvä merkitä seuraava mahdollinen kalibrointipäivämäärä tai milloin se on viimeksi kalibroitu.

Valittaessa pipettiin kärkiä on syytä testata tai selvittää mitkä kärjet kyseessä olevaan pipettiin ovat parhaita. Pipetoinnin aikana on hyvä myös tarkistaa, pysyvätkö pipettien kärjet hyvin kiinni ja etteivät kärjet pääse vuotamaan. Sähköpipettejä käytettäessä on huolehdittava myös kalibroinneista, mutta myös siitä, että akut kestävät koko työskentelyn ajan. Jos esimerkiksi kesken työn akku tyhjenee ja sähköpipetin sijaan joudutaan ottamaan automaattipipetti käyttöön, ei työn jälki kyseiselle kuoppalevyille pysy samana. Sähköpipettiä käytettäessä tulee myös seurata sen toimintoja, koska jos esimerkiksi laittaa toiminnoksi 4x100 µl pipetointimääräksi, pipettiä on ensin painettava yhden kerran, jolloin pieni määrä näytettä poistuu kärjistä. Tämän jälkeen pipetti tyhjenee neljä kertaa tarvittavat 100 µl:a, jonka jälkeen vielä loput tyhjennetään reagenssiastian. Työskentelyn aikana on siis katsottava, ettei viimeistä tai ensimmäistä pisaraa vahingossa pipetoi kuoppalevyille.

Tässä työssä käytetyt valmiina tilattavia kittejä valmistetaan yleensä tietty määrä valmiiksi, esimerkiksi 100 kappaletta, jolloin koko määrä on todennäköisesti melko samanlailla tehtyjä ja ovat näin ollen samaa sarjanumeroa. Hyvin pieniä konsentraatiopitoisuuksia pipetoitaessa pienetkin eroavaisuudet voivat vaikuttaa tuloksiin. Näin ollen kittejä tilattaessa kannattaisi mainita, että haluaa samaan sarjanumeroon kuuluvia kittejä, jolloin tehdas voi valmistaa niitä sen mukaan, mikä on tarve. Aloitettaessa suuren näytemäärän analysointia, tilatessa olisi hyvä mainita, että tarvitaan esimerkiksi 60 kuoppalevyä ja että niiden tulisi olla samaa sarjaa.

Näyteputkien ollessa niin sanotusti syviä, on haasteellista saada pipetin varsi pysymään puhtaana. Pipetti on laskettava syvälle näyteputken sisälle, jolloin sen varsi osuu helposti näyteputken seinään, jolloin syntyy kontaminaatio. Tällöin pipetti tulee desinfioida jokai-



sen pipetoinnin välissä esimerkiksi 70 %:sella etanolilla. Suuria näytemääriä käsiteltäessä olisi ehkä hyvä miettiä näytteiden kaatamista syvistä näyteputkista pienempiin näyteputkiin, jolloin pipetti ei pääsisi kontaminoitumaan. Jokaisen pipetointikerran jälkeen desinfiointi on melko hidasta ja vaarana voi myös olla, ettei sitä muista aina suorittaa. Haasteena näytteiden kaatamisessa pienempiin näyteputkiin voi kuitenkin olla kontaminaatio myös tai mahdollisesti ohi kaataminen, jolloin näytettä joutuu hukkaan. Paras tapa, mikä todettiin, oli pipetin varren desinfiointi jokaisen pipetoinnin jälkeen. Toimenpide voi kuitenkin paljon ylimääräistä aikaa.

Pipetoinnin suorittamisessa voi myös olla monia haasteita. Ensimmäiseksi tulee miettiä, että pieniä näytemääriä pipetoitaessa niin kutsutulla käänteisellä pipetoinnilla saadaan luotettavampi tilavuus ja tällä keinolla estetään myös mahdollisten ilmakuplien syntyminen. Pipetoidessa reagensseja monia kertoja peräkkäin negatiivisella pipetoinnilla, jonka jälkeen näytteet pipetoidaan tavallisella tavalla (tämä siksi, että vältetään turhaa näytteen kontaminaatiota ottamalla sitä ensin pipetin kärkeen, pipetoimalla osa pois ja sitten siirtämällä loppunäyte takaisin näyteputkeen) on riskinä vahingossa pipetoida käänteisesti ja välillä tavallisesti. Riskinä voi myös olla se, että käänteistä pipetointia käytettäessä tyhjentääkin koko pipetin kärjen sisällön kuoppalevyille, jolloin tilavuus ei enää ole sama.

Pipetointitilavuuden olisi olennaista pysyä koko ajan mahdollisimman samana ja siksi esimerkiksi pipetin kärkeen jäänyt näyte- tai reagenssitippa tulisi joka kerta saman lailla irrottaa esimerkiksi kuoppalevyn yläosan pintaan. Pipetointitekniikka kuoppalevyyn on myös selvitettävä, että mikä on työskentelyn alla olevalle kuoppalevyille oikea eli millä tavalla näyte pipetoidaan kuopan pohjaan.

Pipetointi vaatii hyvää keskittymistä ja kaikki mahdollinen häiriötekijä olisi hyvä sulkea pois. Kuoppalevyille pipetoitavat määrät ovat hyvin pieniä eikä niitä helposti erota kuopan pohjalta. On siis jatkuvasti oltava tarkkana, mihin kohtaan näytettä ja reagensseja on jo pipetoitu, jottei vahingossa pipetoi samaan kaivoon kahta kertaa tai jätä joitakin kaivoja tyhjiksi. Esimerkkinä, jos kollega tulee kysymään jotain kesken pipetoinnin, on tarkkaan laitettava merkki, mistä jatkaa. Tässä kohtaa auttaa pipettien kärkien pitäminen samassa järjestyksessä telineessä, kuin mihin pipetoi kuoppalevyllä.

Pipetoinnin toistettavuuden ongelmana on myös se, että suuria määriä pipetoitaessa käden mahdollinen väsyminen on otettava huomioon. Ergonomia yleensäkin on tärkeä osa

työskentelyä ja esimerkiksi automaattipipetillä tunteja päivässä pipetoitaessa peukalo väsyä eikä pipetointijälki enää ole yhtä tasaista eikä näin ollen tulos ole enää luotettava. Yli 300 tuntia vuodessa pipetoivilla henkilöillä on todettu rasitusvammoja yläraajoissa, peukalon lihaksissa ja jänteet ovat ylikuormittuneet. Näistä voi aiheutua osittainen tai täydellinen kyvyttömyys tehdä vastaavia töitä. Pipetoinnin lisäksi peukaloa rasittaa myös männän painaminen alas, jotta pipetin kärki saadaan irtoamaan. Tähän joudutaan käyttämään voimaa jopa 2500 gramman painon verran, jolloin peukalo kuormittuu hyvin paljon.

Pipetoitaessa käsi on hyvä saada nojaamaan esimerkiksi pöytää vasten ja toisella kädellä tukea pipetikättä niin, että käsi pysyy tukevasti paikoillaan eikä pääse tärisemään tai heilumaan. Tämä tukee sekä pipetoinnin suorittamista, että ergonomiaa. Työtä olisi hyvä myös tauottaa ja koettaa jakaa työkuormitusta molemmille käsille niissä töissä, missä siihen on mahdollisuus. Myös pelkän peukalon käyttöä pipetoinnissa voisi koettaa välttää.

Pipetoinnin aikana syntyy helposti ilmakuplia, jos pipetin tyhjentää esimerkiksi liian nopeasti tai voimakkaasti. Varsinkin liuoksen pinnalle muodostuu helposti pieniä ilmakuplia ja mitatessa tulokset voivat olla virheellisiä. Inkubointi tasoravistelijan päällä, esimerkiksi ensimmäiset 15 minuuttia, voi auttaa hajottamaan mahdollisesti syntyneet ilmakuplat. Kitin ohjeessa tästä ei mainittu, mutta työtä tehtäessä tämä havaittiin.

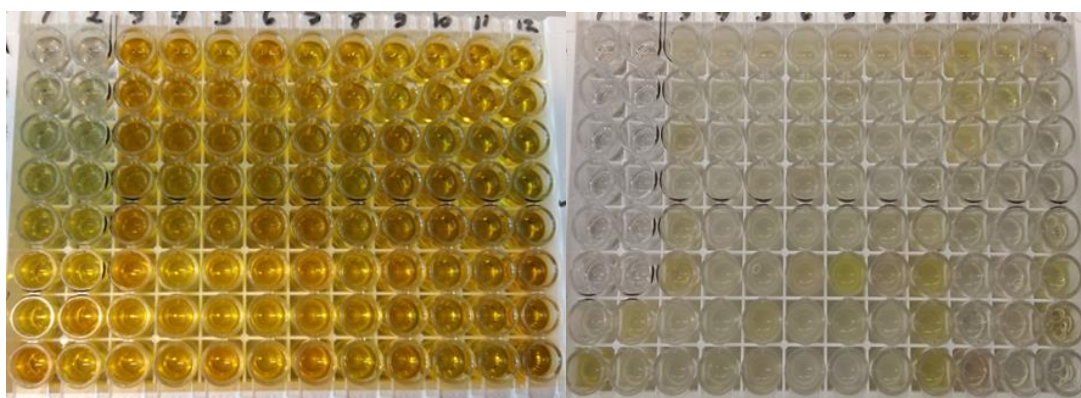
Pipetoinnin aikana kontaminaatiovaara kuoppien välillä on myös melko helposti tapahtuva virhe. Pipetin kärki on ehdottomasti vaihdettava jokaista näytettä pipetoidessa. Reagenssin lisäyksen jälkeen pipetinkärjet on aina vaihdettava, jos kärjet osuvat nesteeseen. Pipetointi on hyvä suorittaa niin, etteivät kärjet pääse koskemaan ollenkaan nesteisiin tai kuoppiin silloin kuin näytteet on jo lisätty. Pesuja suoritettaessa on tarkastettava, etteivät kaivot pääse täyttymään liikaa ja nesteet sekoittumaan kuoppalevyjen välillä.

Näytteitä analysoitaessa olisi hyvä muistaa myös huomioida näytteiden ikä. Esimerkiksi seerumin ollessa pitkään pakastimessa ja jatkuva uudelleen sulatus ja pakastaminen näytteiden ottoa varten voi heikentää seerumin tilaa ja tulokset eivät ole välttämättä enää luotettavia.

Tässä työssä tehty määrittäminen oletettiin olevan polyklonaalinen vasta-ainemäärittäminen, mutta koska kitissä ei asiasta mainittu tuotesalaisuuden takia, asia jäi oletukseksi. Menetelmä tunnistaa vapaan TIMP-1-kudosinhibiittorin sekä kompleksin TIMP-1- kudosinhibiittorin, MMP-1-proteinaasin, MMP-3-proteinaasin sekä MMP-9-proteinaasin kanssa. Menetelmän pääteltiin olevan polyklonaalinen, koska se näyttäisi tunnistavan useita antigeenejä.

Tehdyn ELISA-menetelmän kitin ohjeen mukaan kuoppalevy on analysoitava 30 minuutin päästä viimeisen reagenssin lisäyksen jälkeen. Tietokoneen mahdollinen ”kaatumien” voi aiheuttaa analyysin tekoon viivästyä ja jos sitä ei saa käynnistettyä ajallaan voi koko analyysin luotettavuus heiketä huomattavasti. Tehtiin testimittaus yhdelle kuoppalevyille 35 minuutin päästä viimeisen reagenssin lisäyksen jälkeen ja verrattiin kuinka paljon absorbanssiarvot pienenevät.

Prosentuaaliset muutokset olivat hyvinkin suuret ja heittelivät välillä 4,55 – 48,77 %:a. Kaikki arvot pienenevät 35 minuutin mittauksen jälkeen ja silmämääräisesti näki keltaisen värin haihtuneen melkoisesti (kuva 12, oikean puoleinen). Testituloksen luotettavuus ei kuitenkaan ole riittävä, koska testauksessa oli vain yksi levy. Tuloksista näkyy kuitenkin mihin suuntaan arvot muuttuva, jos mittauksista ei voida suorittaa annetun ajan puitteissa. Tehtiin myös yksi mittaus seuraavana päivänä jääkaapissa säilytetystä levystä, mutta arvot olivat jo niin vähäisiä ja keltainen väri juuri ja juuri erottui, joten mittaus oli melko turha.



Kuva 12. Värimuutokset

## 9 Päätelmät

Työn tavoitteena oli mitata TIMP-kudosinhibiittorin pitoisuudet ELISA-menetelmällä, analysoida näytteiden sekä standardien muuttumissuhdetta kuoppalevyjen välillä laadunvarmistuksen todentamiseksi. Tuloksista voitiin päätellä, että ELISA-menetelmä on luotettava tapa analysoida TIMP-kudosinhibiittorin pitoisuuksia, koska tulosten vaihtelua ei juuri havaittu. Menetelmän todettiin olevan myös melko hidas tapa analysoida näytteitä, koska työskentelyn aikana on useita eri vaiheita sekä inkubaatioaikoja, jotka vievät aikaa. Pipetoinnin suhteen työssä on oltava tarkkana, koska virheiden mahdollisuus on aina olemassa varsinkin suuria näytemääriä analysoitaessa.

## Lähteet

- 1 Lieberman, Michael. Marks, D. Allan. 2009. Basic medical biochemistry. s.948. Clinical approach. 3. painos. Lippincott Williams & Wilkins, A.Wolters Kluwer business.
- 2 Uitto, V. J. ym. 2003. Proteolytic host enzymes in gingival crevicular fluid. *Periodontol* 2000 31, 77–104.
- 3 Oral Dis 2. Sorsa, Timo ym. 2006. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 38.
- 4 Lieberman, Michael. Marks, D. Allan. Basic medical biochemistry. 2009. Clinical approach. 3. painos. Lippincott Williams & Wilkins, A.Wolters Kluwer business.
- 5 Trung T. ym. 2016. Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing. In *tec. Verkkodokumentti*. <https://www.intechopen.com/books/wound-healing-new-insights-into-ancient-challenges/roles-of-matrix-metalloproteinases-in-cutaneous-wound-healing>. Luettu 8.6.2017.
- 6 Docherty, A. J. P. ym. 1992. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. Prospects for treating degenerative tissue diseases. TIBTECH.
- 7 Johnson, Jason, Lee. 2014. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in cardiovascular pathologies: current knowledge and clinical potential. University of Bristol. United Kingdom.
- 8 Kustannus Oy Duodecim. Verkkodokumentti. [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti/%5C%5Cwww.ktl.fi/http/%5C%5Cwww.toh-tori.fi/%5C%5Cwww.kaapeli.fi/~mies/tk.koti?p\\_osio=&p\\_artikkeli=uut13648](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti/%5C%5Cwww.ktl.fi/http/%5C%5Cwww.toh-tori.fi/%5C%5Cwww.kaapeli.fi/~mies/tk.koti?p_osio=&p_artikkeli=uut13648). Luettu 26.4.2014.
- 9 Solunetti. Väliaineen hajotus. Verkkodokumentti. [http://www.solunetti.fi/fi/solu-biologia/soluvaliaineen\\_hajotus/](http://www.solunetti.fi/fi/solu-biologia/soluvaliaineen_hajotus/). Luettu 6.6.2017.
- 10 Jennifer A.Jacobsen ym. 2010. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Sivut 72-94. Verkkodokumentti. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488909002080>. Luettu 10.9.2017
- 11 Roosmarijn E Vandenbroucke ym. 2014. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? PubMed. Verkkodokumentti. [https://www.researchgate.net/figure/267931232\\_fig4\\_Figure-2-Nomenclature-of-the-substrate-protease-interaction-Multiple-enzymatic-binding](https://www.researchgate.net/figure/267931232_fig4_Figure-2-Nomenclature-of-the-substrate-protease-interaction-Multiple-enzymatic-binding). Luettu 10.9.2017.
- 12 Whittaker, M. ym.1999. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev* 99:2735–2776.

- 13 Jiangning Song ym. 2011. Bioinformatic approaches for predicting substrates of proteases. PubMed. Verkkodokumentti. [https://www.researchgate.net/figure/49843238\\_fig1\\_Fig-1-The-nomenclature-of-protease-substrate-specificity-Amino-acid-residues-in-the](https://www.researchgate.net/figure/49843238_fig1_Fig-1-The-nomenclature-of-protease-substrate-specificity-Amino-acid-residues-in-the). Luettu 8.9.2017.
- 14 Sternlicht M.D., Werb, Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- 15 Gomez D.E. ym. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. Oct; 74(2):111-22.
- 16 Howard EW, ym. 1991. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Bio Chem* 266, 13070-13075.
- 17 Enzo Life Sciences, Inc. 2017. TIMP-1 (human) ELISA kit. Verkkodokumentti. <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-KIT147/timp-1-human-elisa-kit/>.
- 18 Murphy, G. 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology*. (11, article 233) PMC free article. PubMed.
- 19 The RCSB PDB. An Information Portal to 133920 Biological Macromolecular Structures. Verkkodokumentti. <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P01033>. Luettu 24.5.2017.
- 20 Enzo Life Sciences, Inc. 2017. TIMP-1 (human) ELISA kit. Verkkodokumentti. <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-KIT147/timp-1-human-elisa-kit/>. Luettu 26.5.2017.
- 21 Jian Cao ym. Biology and chemistry of matrix metalloproteinases (MMPs). Stony Brook University, Stony Brook, N.Y. Verkkodokumentti. <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11034>
- 22 MacColl, Elisabeth. Khalilhttp, Raouf A. 2015. Pharmacology and Experimental Therapeutics December. Verkkodokumentti. [//jpet.aspetjournals.org/content/355/3/410](http://jpet.aspetjournals.org/content/355/3/410).
- 23 Brew, Keith. Nagase, Hideaki. 2011. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. PMC. Verkkodokumentti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853873/>. Luettu 11.9.2017
- 24 MacColl, Elisabeth and Khalil, Raouf A. 2015. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Verkkodokumentti. <http://jpet.aspetjournals.org/content/355/3/410/tab-figures-data>. Luettu 26.5.2017.

- 25 Sorsa, T., Tjäderhane, L., Konttinen, Y.T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M., et al. 2006. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 38.
- 26 Hasty, K. A., Jeffrey, J. J., Hibbs, M. S., Welgus, H. G. 1987. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 262.
- 27 Birkehal-Hansen, H. 1993. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*.
- 28 The RCSB PDB. Neutrophil collagenase - P22894 (MMP8\_HUMAN). Verkkodokumentti. <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P22894>. Luettu 25.5.2017.
- 29 Birkehal-Hansen, H. 1993. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*.
- 30 Hästbacka, Johanna ym. 2014. Serum MMP-8 and TIMP-1 in critically ill patients with acute respiratory failure: TIMP-1 is associated with increased 90-day mortality, Anesthesia and analgesia.
- 31 Matthey, Derek L. ym. 2012. Association of circulating levels of MMP-8 with mortality from respiratory disease in patients with rheumatoid arthritis. *Julkaisussa: Arthritis research & therapy*. Vol.14(5).
- 32 Mäntylä, P. ym. 2003. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res* 38, 436–439.
- 33 UniProt Consortium. 2002 – 2017. UniProtKB - P22894 (MMP8\_HUMAN). Verkkodokumentti. <http://www.uniprot.org/uniprot/P22894>. Luettu 7.5.2017.)
- 34 Mohammed, F. F. ym. 2003. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. Verkkodokumentti. [http://ard.bmj.com/content/62/suppl\\_2/ii43](http://ard.bmj.com/content/62/suppl_2/ii43). Luettu 11.9.2017
- 35 Davies, C. 2005. Introduction to Immunoassay. *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd.
- 36 Solunetti. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen. Verkkodokumentti. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten\\_vasta-aineiden\\_tuottaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten_vasta-aineiden_tuottaminen/2/). Luettu 15.5.2017.
- 37 Edu.fi. Opetushallitus. Vasta-ainemääritys. Verkkodokumentti. [http://www.edu.fi/download/143332\\_Vasta\\_ainemaaritys.pdf](http://www.edu.fi/download/143332_Vasta_ainemaaritys.pdf). Luettu 16.4.2017.
- 38 Search Engine Optimization. Image Gallery: sperm antibodies. Verkkodokumentti. <http://keywordsuggest.org/gallery/587264.html>. Luettu 1.9.2017.

- 39 Boenisch, Thomas. 2002. Immunochemical Stain Methods. 3.painos. Dako Corporation. Kalifornia.
- 40 Solunetti. Vasta-aineet. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/2/>. Luettu 5/2017.
- 41 Antibody Source Book. HUCAL Custom Antibody Generation Inquiries.
- 42 The free dictionary. Immunoglobulin. Verkkodokumentti. <http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/immunoglobulin>  
<https://www.slideshare.net/borhanihm/immunohistochemistry-46882311>. Luettu 16.9.2017.
- 43 Solunetti. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen. Verkkodokumentti. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten\\_vasta-aineiden\\_tuottaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten_vasta-aineiden_tuottaminen/2/). Luettu 15.5.2017.
- 44 Boenisch, Thomas. 2002. Immunochemical Stain Methods. 3. painos. Dako Corporation. California.
- 45 Antibody Source Book. HUCAL Custom Antibody Generation Inquiries.
- 46 Todennäköisyys ja tilastot. Etälukio. Pitkä matematiikka. Verkkodokumentti. [http://www02.oph.fi/etalukio/pitka\\_matematiikka/kurssi6/img33.gif](http://www02.oph.fi/etalukio/pitka_matematiikka/kurssi6/img33.gif)
- 47 KvantiMOTV. Hajontaluvut. Verkkodokumentti. <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html#variaatiosuhde>. Luettu 12.5.2017.
- 48 Keskiarvo ja mediaani. Akin menetelmäblogi. Verkkodokumentti. <https://tilastoapu.wordpress.com/tag/mediaani/>. Luettu 8.9.2017.
- 49 GE Healthcare. Amersham Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1), Human, Biotrak, ELISA System. Product Booklet.
- 50 Turkoglu, Oya, Baris, Nezihi, Tervahartiala, Taina, Sxenarslan , Ömer, Sorsa, Timo, Atilla, Gul. Evaluation of Systemic Levels of Neutrophilic Enzymes in Patients With Hypertension and Chronic Periodontitis. 2014. J Periodontol. <file:///C:/Users/S/Downloads/Tukoglu%20et%20al.pdf>. Luettu 22.11.2017.
- 51 Kormi,Immi, Nieminen, T, Mikko, Havulinna Aki, Zeller, Tanja, Blankenberg , Stefan, Tervahartiala, Taina , Sorsa, Timo, Salomaa, Veikko ja Pussinen, , Pirkko. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 predict incident cardiovascular disease events and all-cause mortality in a population-based cohort. 2017. European Journal of Preventive Cardiology. [journals.sagepub.com](http://journals.sagepub.com). Luettu 22.11.2017.



## Kuoppalevyjen väliset vertailut

| Levyjen väliset mittaukset |        |        |        |        |          |         |           |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|-----------|
|                            | Levy1  | Levy 2 | Levy 3 | Levy 4 | %CV      | Ka.     | Keskihaj. |
| Näyte 1                    | 56,499 | 69,929 | -      | -      | 15,022   | 63,2139 | 9,4961    |
| Näyte 2                    | 74,838 | 65,185 | -      | -      | 9,7492   | 70,0112 | 6,8256    |
| Näyte 3                    | 119,82 | 105,66 | 100,78 | -      | 9,0963   | 108,754 | 9,8926    |
| Näyte 4                    | 87,939 | 77,596 | -      | -      | 8,8366   | 82,7674 | 7,3138    |
| Näyte 5                    | 93,08  | 87,182 | -      | -      | 4,6269   | 90,1313 | 4,1702    |
| Näyte 6                    | 66,139 | 67,112 | -      | -      | 1,0327   | 66,6257 | 0,6881    |
| Näyte 7                    | 58,034 | 45,306 | -      | -      | 17,419   | 51,6698 | 9,0002    |
| Näyte 8                    | 116,65 | 109,95 | 57,029 | -      | 34,545   | 94,5413 | 32,659    |
| Näyte 9                    | 74,668 | 86,252 | -      | -      | 10,18    | 80,46   | 8,1909    |
| Näyte 10                   | 51,587 | 61,077 | -      | -      | 11,913   | 56,3319 | 6,7108    |
| Näyte 11                   | 61,351 | 67,701 | -      | -      | 6,9583   | 64,526  | 4,4899    |
| Näyte 12                   | 63,465 | 60,963 | -      | -      | 2,8442   | 62,2138 | 1,7695    |
| Näyte 13                   | 103,52 | 103,22 | 100,57 | -      | 1,5856   | 102,436 | 0,2123    |
| Näyte 14                   | 99,676 | 93,905 | 100,51 | -      | 3,6704   | 98,0314 | 4,0808    |
| Näyte 15                   | 48,033 | 45,478 | 56,791 | 61,499 | 14,126   | 52,9503 | 7,4799    |
| Näyte 16                   | 104,41 | 110,44 | -      | -      | 3,9726   | 107,425 | 4,2675    |
| Näyte 17                   | 105,45 | 113,78 | -      | -      | 5,3722   | 109,616 | 5,8888    |
| Näyte 18                   | 97,617 | 89,145 | -      | -      | 6,4147   | 93,381  | 5,9901    |
| Näyte 19                   | 1,0451 | 1,0751 | -      | -      | 1,9986   | 1,0601  | 0,0212    |
| Näyte 20                   | 2,5288 | 2,7766 | -      | -      | 6,605    | 2,65269 | 0,1752    |
| Näyte 21                   | 0,9877 | 1,2181 | -      | -      | 14,772   | 1,10293 | 0,1629    |
| Näyte 22                   | 74,567 | 74,457 | -      | -      | 0,1044   | 74,5119 | 0,0778    |
| Näyte 23                   | 75,069 | 61,368 | -      | -      | 14,201   | 68,2184 | 9,6877    |
| Näyte 24                   | 66,663 | 73,457 | -      | -      | 6,8575   | 70,0598 | 4,8044    |
| Näyte 25                   | 56,926 | 63,033 | 72,459 | -      | 9,8387   | 64,1396 | 7,8254    |
| Näyte 26                   | 93,863 | 104,94 | 85,391 | -      | 1,0346   | 94,7298 | 9,8011    |
| Näyte 27                   | 99,125 | 110,83 | 97,687 | -      | 7,0286   | 102,546 | 7,2076    |
| Näyte 28                   | 90,503 | 100,08 | 75,993 | -      | 13,647   | 88,858  | 12,126    |
| Näyte 29                   | 102,14 | 107,99 | -      | -      | 3,938    | 105,063 | 4,1374    |
| Inter assay average %CV    |        |        |        |        | 8,530682 |         |           |

## Kuoppalevyjen sisäiset vertailut

### Standardi 1

| Std1 |          |                         |           |             |          |
|------|----------|-------------------------|-----------|-------------|----------|
|      | Tulos 1  | Tulos 2                 | Ka.       | Stand.Dev.  | %CV      |
| 1    | 0,258277 | 0,249132                | 0,2537045 | 0,006466492 | 2,548828 |
| 2    | 0,218745 | 0,198457                | 0,208601  | 0,014345782 | 6,87714  |
| 3    | 0,197079 | 0,181893                | 0,189486  | 0,010738124 | 5,666975 |
| 4    | 0,189889 | 0,169919                | 0,179904  | 0,014120922 | 7,849143 |
| 5    | 0,21593  | 0,170756                | 0,193343  | 0,031942842 | 16,52133 |
| 6    | 0,247177 | 0,232451                | 0,239814  | 0,010412854 | 4,342054 |
| 7    | 0,218644 | 0,204198                | 0,211421  | 0,010214865 | 4,831528 |
| 8    | 0,197128 | 0,189094                | 0,193111  | 0,005680896 | 2,941777 |
| 9    | 0,213492 | 0,201569                | 0,2075305 | 0,008430834 | 4,062455 |
| 10   | 0,191415 | 0,156406                | 0,1739105 | 0,024755101 | 14,23439 |
| 11   | 0,207117 | 0,202079                | 0,204598  | 0,003562404 | 1,741172 |
| 12   | 0,222294 | 0,211272                | 0,216783  | 0,007793731 | 3,595176 |
| 13   | 0,194754 | 0,180658                | 0,187706  | 0,009967377 | 5,3101   |
| 14   | 0,159097 | 0,155899                | 0,157498  | 0,002261327 | 1,435782 |
| 15   | 0,209394 | 0,199949                | 0,2046715 | 0,006678624 | 3,263094 |
| 16   | 0,14697  | 0,136666                | 0,141818  | 0,007286028 | 5,137591 |
|      |          | Intra assay average %CV |           |             | 5,647409 |

Standardi 2

| Std2 | Tulos 1  | Tulos 2                 | Ka.       | Stand.Dev.  | %CV      |
|------|----------|-------------------------|-----------|-------------|----------|
| 1    | 0,394133 | 0,372329                | 0,383231  | 0,015417756 | 4,023097 |
| 2    | 0,363945 | 0,550989                | 0,457467  | 0,132260081 | 28,91139 |
| 3    | 0,294756 | 0,295458                | 0,295107  | 0,000496389 | 0,168206 |
| 4    | 0,318668 | 0,297456                | 0,308062  | 0,014999149 | 4,868873 |
| 5    | 0,297652 | 0,278755                | 0,2882035 | 0,013362197 | 4,636376 |
| 6    | 0,389719 | 0,38144                 | 0,3855795 | 0,005854137 | 1,51827  |
| 7    | 0,362426 | 0,343411                | 0,3529185 | 0,013445635 | 3,809841 |
| 8    | 0,319416 | 0,304726                | 0,312071  | 0,010387399 | 3,328537 |
| 9    | 0,334936 | 0,329115                | 0,3320255 | 0,004116069 | 1,239684 |
| 10   | 0,247154 | 0,252952                | 0,250053  | 0,004099805 | 1,639574 |
| 11   | 0,333571 | 0,305469                | 0,31952   | 0,019871115 | 6,219052 |
| 12   | 0,346288 | 0,328135                | 0,3372115 | 0,012836109 | 3,806546 |
| 13   | 0,289196 | 0,290737                | 0,2899665 | 0,001089652 | 0,375785 |
| 14   | 0,245792 | 0,235138                | 0,240465  | 0,007533516 | 3,132895 |
| 15   | 0,309079 | 0,311566                | 0,3103225 | 0,001758575 | 0,566693 |
| 16   | 0,230735 | 0,214474                | 0,2226045 | 0,011498263 | 5,165333 |
|      |          | Inter assay average %CV |           |             | 4,588135 |

Standardi 3

| Std3 | Tulos 1  | Tulos 2                 | Ka.       | Stand.Dev.  | %CV      |
|------|----------|-------------------------|-----------|-------------|----------|
| 1    | 0,660226 | 0,629392                | 0,644809  | 0,02180293  | 3,381301 |
| 2    | 0,552638 | 0,531245                | 0,5419415 | 0,015127135 | 2,791286 |
| 3    | 0,565991 | 0,645986                | 0,6059885 | 0,056565007 | 9,334337 |
| 4    | 0,566944 | 0,537386                | 0,552165  | 0,020900662 | 3,78522  |
| 5    | 0,533779 | 0,499722                | 0,5167505 | 0,024081936 | 4,660264 |
| 6    | 0,71742  | 0,724716                | 0,721068  | 0,005159051 | 0,715474 |
| 7    | 0,647944 | 0,614601                | 0,6312725 | 0,023577061 | 3,734847 |
| 8    | 0,561395 | 0,529323                | 0,545359  | 0,022678329 | 4,158422 |
| 9    | 0,648447 | 0,61467                 | 0,6315585 | 0,023883946 | 3,781747 |
| 10   | 0,463153 | 0,449388                | 0,4562705 | 0,009733325 | 2,133236 |
| 11   | 0,589095 | 0,560807                | 0,574951  | 0,020002637 | 3,479016 |
| 12   | 0,649405 | 0,623136                | 0,6362705 | 0,018574988 | 2,919354 |
| 13   | 0,531958 | 0,510221                | 0,5210895 | 0,01537038  | 2,949662 |
| 14   | 0,438553 | 0,434507                | 0,43653   | 0,002860954 | 0,655385 |
| 15   | 0,561362 | 0,556027                | 0,5586945 | 0,003772415 | 0,67522  |
| 16   | 0,402694 | 0,379167                | 0,3909305 | 0,016636101 | 4,255514 |
|      |          | Intra assay average %CV |           |             | 3,338143 |

Standardi 4

| Std4 | Tulos 1  | Tulos 2                 | Ka.       | Stand.Dev.  | %CV      |
|------|----------|-------------------------|-----------|-------------|----------|
| 1    | 1,1535   | 1,14063                 | 1,147065  | 0,009100464 | 0,79337  |
| 2    | 0,983035 | 0,934896                | 0,9589655 | 0,034039413 | 3,549597 |
| 3    | 1,007    | 1,00256                 | 1,00478   | 0,003139554 | 0,312462 |
| 4    | 1,07777  | 1,02913                 | 1,05345   | 0,034393674 | 3,264861 |
| 5    | 0,971949 | 1,02018                 | 0,9960645 | 0,034104467 | 3,423922 |
| 6    | 1,35196  | 1,28171                 | 1,316835  | 0,049674251 | 3,772246 |
| 7    | 1,18286  | 1,36726                 | 1,27506   | 0,13039049  | 10,22622 |
| 8    | 1,06956  | 0,983324                | 1,026442  | 0,06097806  | 5,940721 |
| 9    | 1,1505   | 1,0759                  | 1,1132    | 0,052750166 | 4,738606 |
| 10   | 0,872529 | 0,860428                | 0,8664785 | 0,008556699 | 0,987526 |
| 11   | 1,07701  | 1,04125                 | 1,05913   | 0,025286138 | 2,387444 |
| 12   | 1,21051  | 1,14415                 | 1,17733   | 0,046923606 | 3,985595 |
| 13   | 0,985748 | 0,979778                | 0,982763  | 0,004221427 | 0,429547 |
| 14   | 0,785025 | 0,782967                | 0,783996  | 0,001455226 | 0,185616 |
| 15   | 1,05756  | 1,05313                 | 1,055345  | 0,003132483 | 0,296821 |
| 16   | 1,3293   | 1,33086                 | 1,33008   | 0,001103087 | 0,082934 |
|      |          | Intra assay average %CV |           |             | 2,773593 |

Standardi 5

| Std5 | Tulos 1 | Tulos 2                 | Ka.      | Stand.Dev.  | %CV      |
|------|---------|-------------------------|----------|-------------|----------|
| 1    | 2,11513 | 2,00087                 | 2,058    | 0,080794021 | 3,925851 |
| 2    | 1,78982 | 1,69741                 | 1,743615 | 0,065343738 | 3,747601 |
| 3    | 1,87628 | 1,85097                 | 1,863625 | 0,017896873 | 0,960326 |
| 4    | 1,93048 | 1,95735                 | 1,943915 | 0,018999959 | 0,977407 |
| 5    | 1,86894 | 1,79099                 | 1,829965 | 0,055118974 | 3,012023 |
| 6    | 2,47081 | 2,44397                 | 2,45739  | 0,018978746 | 0,772313 |
| 7    | 2,19038 | 2,15979                 | 2,175085 | 0,021630396 | 0,994462 |
| 8    | 1,99747 | 1,82248                 | 1,909975 | 0,123736616 | 6,478442 |
| 9    | 1,97422 | 2,01439                 | 1,994305 | 0,028404479 | 1,42428  |
| 10   | 1,64991 | 1,64318                 | 1,646545 | 0,004758829 | 0,289019 |
| 11   | 1,9154  | 1,93151                 | 1,923455 | 0,01139149  | 0,592241 |
| 12   | 2,2857  | 2,19873                 | 2,242215 | 0,061497077 | 2,742693 |
| 13   | 1,81256 | 1,74018                 | 1,77637  | 0,051180389 | 2,881178 |
| 14   | 1,51111 | 1,50135                 | 1,50623  | 0,006901362 | 0,458188 |
| 15   | 1,98202 | 1,93619                 | 1,959105 | 0,032406704 | 1,654159 |
| 16   | 1,3293  | 1,33086                 | 1,33008  | 0,001103087 | 0,082934 |
|      |         | Intra assay average %CV |          |             | 1,93707  |

## Reagenssit

Työpuskuri: 0,1 M fosfaattipuskuri, 0,9%(w/v) natriumkloridi, 0,1%(w/v) naudan seerumin albumiini ja 0,1% ja Tween 20.

Standardit: 100 ng kylmäkuivattu TIMP-1. Laimennettuna 0,1M työpuskurilla, saatiin standardien kantaliuoksen konsentraatioksi 100 ng/ml.

Peroksidaasi konjugaatti: Kylmäkuivattu anti-TIMP-1 piparjuuri peroksidaasi

Pesupuskuri: 12,5 ml fosfaattipuskuri, jonka konsentraatio on laimennuksen jälkeen 0,01M. 0,05%:nen Tween 20.

TMB substraatti: Käyttövalmis 3,3', 5,5' – tetrametyyllibentsidiini-vetyperoksidi.

Pysäytysliuos: 1,0 M rikkisulfidi

Mikrokuoppalevy: Käyttövalmis 12 x 8 anti-TIMP-1:sellä päällystettyä kaivoa.

## Välineet

### Pipetit:

- Thermo Fisher automaattiharavapipetti (50 - 300 µl). T20022/4510. Kalibroitu 29.6.2015.
- Biohit, e1200 (50 - 1200 µl) .Kahdeksan rivin sähköharavapipetti. Kalibroitu 3.4.2017.
- Thermo Fisher automaattipipetti (0,5 - 5 ml). Finnpipette F1. Kalibroitu 8.12.2015
- Thermo Fisher automaattipipetti (100 - 100 µl). GJ16491. Kalibroitu 8.12.2015.
- Thermo Fisher automaattipipetti (2 – 10 µl). Kalibroitu 8.12.2015.

### Pipetin kärjet:

- Fishesbrand SureOne (200 µl).
- BioHit (1000 µl)
- TipOne (500 µl)

Muut välineet ja aineet:

- 100 ml:n mittalasi, 500 ml:n mittalasi, laboratoriovesi, tasoravistelijä, 1,5 ml:n näyteputkia, reagenssikaivoja.

Kuoppalevyn lukija:

- VICTOR X4 kuoppalevyn lukija. Multilabel Reader. Perkin Elmer. (49).